



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/61661</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 2 décembre 1999 (02.12.99)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/01247 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 27 mai 1999 (27.05.99)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/06866 27 mai 1998 (27.05.98) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> MOUGIN, Bruno [FR/FR]; 29, rue Lamartine, F-69003 Lyon (FR). LAAYOUN, Ali [FR/FR]; Triangle Fleuri, 1, rue du Rhône, F-69007 Lyon (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR AMPLIFYING AT LEAST A PARTICULAR NUCLEOTIDE SEQUENCE AND PRIMERS USED		
<b>(54) Titre:</b> PROCEDE D'AMPLIFICATION D'AU MOINS UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE PARTICULIERE ET AMORCES DE MISE EN OEUVRE		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention concerns a method for amplifying at least a particular nucleotide sequence of a synthetic or natural nucleic acid contained in a reaction mixture, the reaction mixture consisting of at least a nucleic acid comprising at least two related nucleotide sequences and/or at least two nucleic acids each comprising at least a related nucleotide sequence; the method uses amplifying primers capable of hybridising with the nucleic acid for amplifying related nucleotide sequences. The invention also concerns primers for implementing such a method. Said method consists in adding, in the reaction mixture, at least a sequence acting as blocking primer capable of: hybridising with at least a nucleotide sequence, which is not the particular nucleotide sequence or sequences to be amplified; preventing at its level the elongation of the amplifying primer. The invention is particularly applicable in the field of techniques for amplifying related genes.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>La présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée; le procédé utilisant des amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées. L'invention concerne également des amorces permettant la mise en oeuvre d'un tel procédé. Ce procédé consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable: de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine des techniques d'amplification de gènes apparentés.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière et amorces de mise en œuvre**

La présente invention concerne un nouveau procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel  
5 contenu dans un mélange réactionnel. Elle concerne également des amorces permettant une telle amplification.

*L'état de la technique décrit des méthodes permettant d'amplifier des séquences nucléotidiques utilisant des amorces spécifiques de ces séquences à amplifier. Ainsi on peut amplifier un gène ou une famille de gènes au sein d'une préparation d'acides  
10 nucléiques. De nombreuses techniques utilisent des oligonucléotides complémentaires de la séquence cible servant d'amorces pour l'élongation par une polymérase.*

*Pour l'amplification des ADN, il existe la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-  
15 A-0.201.184, ou la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069.*

*Pour l'amplification des ARN, plusieurs techniques ont aussi été décrites dans différents documents. Ces techniques sont les suivantes :*

- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-  
20 90/06995,*
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818,*
- SPSR (Single Primer Sequence Replication) avec le brevet US-A-5,194,370, et*
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.*

Cependant, ces techniques imposent un choix rigoureux des amorces  
25 d'amplification. En effet, des amorces peu spécifiques de la séquence d'intérêt vont permettre l'amplification de nombreuses séquences apparentées sur lesquelles elles se seront fixées. L'amplicon correspondant à la séquence d'intérêt se retrouvera donc dilué dans un mélange d'amplicons, ce qui ne facilitera pas l'utilisation de ce produit  
30 d'amplification. Dans ces conditions, s'impose alors le choix rigoureux d'une région de la séquence nucléotidique qui soit suffisamment spécifique pour permettre de produire

une amorce complémentaire tout aussi spécifique. Toutefois, d'autres problèmes peuvent apparaître lors du choix de la séquence à utiliser pour l'hybridation de l'amorce. En effet, il arrive que la région réellement spécifique soit unique et se trouve à l'intérieur de la séquence d'intérêt. Le choix d'hybrider une amorce au niveau d'une telle région  
5 implique de n'obtenir qu'une fraction plus ou moins importante de ladite séquence d'intérêt. On a donc une perte d'information. De plus, l'obtention d'une amorce spécifique de la séquence nucléotidique d'intérêt apporte un surcroît important de difficulté et de travail.

10 Avec la présente invention, on s'affranchit des risques d'obtention de produits d'amplification tronqués et des difficultés à obtenir des amorces spécifiques de la séquence nucléotidique à amplifier, puisqu'il est possible d'amplifier spécifiquement la séquence nucléotidique d'intérêt dans des conditions d'hybridation classiques.

Pour ce faire, on utilise deux types d'amorces complémentaires, d'une part, un  
15 type d'amorces qui s'hybride indifféremment sur toutes les séquences nucléotidiques apparentées et, d'autre part, un type d'amorces où chaque amorce s'hybride sur une seule de ces séquences apparentées. Les premières, qui sont non-spécifiques, vont servir d'amorces pour l'élongation, les secondes, spécifiques de séquences nucléotidiques apparentées à la séquence d'intérêt, vont servir d'amorces de blocage de l'élongation de  
20 certaines de ces séquences nucléotidiques apparentées.

Dans le cas où on utilise un mélange d'amorces non spécifiques et spécifiques, selon le choix du type de séquences spécifiques utilisées, on peut empêcher l'élongation de certaines séquences non spécifiques. Il est alors possible de sélectionner les amplicons  
25 que l'on obtient.

Ainsi, on peut bloquer l'amplification de certaines séquences apparentées que l'on ne souhaite pas amplifier, par l'intermédiaire d'un ajout de séquences complémentaires, spécifiques de ces séquences apparentées, séquences complémentaires spécifiques qui font office d'amorces de blocage. Ainsi on isole la ou les séquences  
30 d'intérêt qui va ou vont être amplifiées sélectivement. On obtient donc un seul amplicon pour chaque séquence d'intérêt pour laquelle aucune amorce de blocage n'a été ajoutée.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées  
5 et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce  
10 de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

Préférentiellement, la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la  
15 ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

Premièrement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de  
20 nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

Deuxièmement, dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, tel que décrit ci-dessus, chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

Ainsi, l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de  
25 l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

De plus, un autre élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

Chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué :

- soit par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou  
30 non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique,

- soit par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

Dans ce cas, l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

5            Selon un premier mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides  
10 modifiés, qui constituent cette boucle

            Selon un second mode de réalisation et dans le cas où l'élément est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique, l'élément est constitué d'une "queue" de  
15 polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

            Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant un élément qui ne permet pas l'élongation, l'élément est substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou au groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

20            Dans le cas d'une amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification comportant, en plus, un élément protecteur, l'élément est :

- substitué au phosphate placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
- greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5'  
25 de l'acide nucléique.

            Les figures ci-jointes sont données à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif.

            La figure 1 représente une vue schématique de principe d'une amplification d'un  
30 brin d'acide nucléique et de son brin complémentaire par l'intermédiaire de deux amorces, dans ce cas qui est le plus simple, il y a une amorce par brin.

La figure 2 représente une vue schématique de principe d'une amplification selon la figure 1 mais utilisant la technique exposée par la présente invention.

La figure 3 représente les différentes substitutions qui peuvent être réalisées sur les nucléotides de l'amorce de blocage où :

- 5 - R1 est un élément qui se trouve à l'extrémité 3' de l'amorce bloquante et qui empêche toute élongation lors de l'amplification,
- R2 est un élément qui peut se trouver sur au moins une des positions 2' du ribose d'un nucléotide de l'amorce bloquante et qui renforce la stabilité du duplex amorce bloquante - acide nucléique, et
- 10 - R3 est un élément qui se trouve à l'extrémité 5' de l'amorce bloquante et qui fait office d'élément protecteur.

La figure 4 représente le positionnement de l'élément R1 à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

15 La figure 5 représente le positionnement de l'élément R3 à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage lorsque ladite amorce est hybridée à l'acide nucléique.

La figure 6 représente le duplex amorce de blocage - acide nucléique où X représente un nucléotide de l'amorce de blocage comportant l'élément R2 qui renforce la stabilité du duplex, en position sur le ribose de ce nucléotide.

20 La figure 7 représente différentes structures qui, par ajout en position 3' de l'amorce bloquante, empêche toute élongation lors de l'amplification.

La figure 8 représente différentes structures qui, par ajout en position 5' de l'amorce bloquante, en complément des modifications en position 3', telles que représentées à la figure 3, font office d'élément protecteur en empêchant la dégradation ou l'éjection de l'amorce de blocage lors de l'amplification.

25 La figure 9 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*1301 et HLA-DRB3\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

30 La figure 10 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-

DRB1\*1301 et HLA-DRB3\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-phosphate / 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> inhibant l'amplification du gène HLA-DRB3.

5           La figure 11 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*0901 et HLA-DRB4\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB sans utilisation d'amorce bloquante.

10           La figure 12 représente l'électrophorégramme correspondant au résultat de la réaction de séquence d'un échantillon d'ADN d'une lignée lymphoblastoïde HLA-DRB1\*0901 et HLA-DRB4\*01, observé pour la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (selon la nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB avec utilisation d'un oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H inhibant l'amplification du gène HLA-DRB4.

15           La figure 13 représente une vue schématique de principe d'une amplification sélective d'un gène dans une famille de gènes apparentés localisé sur un même chromosome.

La présente invention concerne donc, entre autre, l'utilisation d'amorces  
20 oligonucléotidiques modifiées en leurs extrémités, pour l'amplification sélective de gènes.

L'invention concerne également une méthode utilisant des amorces oligonucléotidiques modifiées, pour l'amplification sélective de certains gènes présents dans un ensemble de gènes apparentés.

25

L'analyse de gènes d'intérêt est facilitée par l'utilisation de techniques d'amplification génique, qui permettent de préparer à partir d'un échantillon biologique, des quantités de matériel spécifique aisément analysable avec les techniques classiques de biologie moléculaire. Ainsi, l'emploi d'amorces oligonucléotidiques, bornant une  
30 région génique, conduit à l'obtention d'un mélange de molécules nucléotidiques considérablement enrichi en la molécule d'intérêt, qui devient alors facilement détectable



par des techniques d'analyse électrophorétique ou des techniques d'hybridation moléculaire. L'efficacité de cette approche réside dans l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des régions géniques à analyser. Ces amorces doivent donc être des séquences oligonucléotidiques capables de s'hybrider sélectivement avec  
5 les séquences nucléiques d'intérêt, présentes dans l'échantillon.

L'analyse de gènes membres de familles de gènes structurellement proches, peut cependant être parfois délicate. La recherche de régions nucléotidiques uniques pour un gène donné permet d'atteindre la spécificité recherchée, mais cette approche peut parfois  
10 s'avérer être difficile voire impossible.

La présente invention consiste donc à combiner l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques pour l'amplification d'un ensemble limité de gènes structurellement proches, et d'amorces oligonucléotidiques modifiées capables de  
15 bloquer spécifiquement les gènes indésirables. En fait, à chaque type de ces amorces modifiés correspond un seul type de gène indésirable.

Cette stratégie permet de simplifier l'analyse de gènes en mélange, par détermination de leur séquence nucléotidique (par séquençage en gel par exemple ou par séquençage par hybridation multiple - DNA Chip -) ou par l'analyse de mutations.  
20

L'invention revendique l'utilisation de mélanges d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification effective de régions nucléiques correspondantes, et d'amorces nucléotidiques bloquantes, chevauchantes ou situées en aval (par rapport à l'amorce nucléotidique permettant l'amplification), constituées d'oligonucléotides ne pouvant  
25 servir de séquences initiatrices pour l'élongation et donc pour l'amplification des séquences en aval.

Ainsi, pour un gène ou un allèle indésirable, l'amorce non bloquante et l'amorce bloquante s'hybrident sur le même brin pour une polarité d'amorce donnée (amorces 5' en amont, ou amorces 3' en aval de la région à analyser). L'amorce non bloquante, si elle  
30 parvient à s'hybrider sur le brin à amplifier, ne peut générer des amplicons au-delà de la

région correspondant au site d'hybridation de l'amorce bloquante, rendant inefficace l'amplification correspondant à l'amorce non bloquante. Ce principe, illustré sur les figures 1, 2 et 13, concerne le fonctionnement des amorces bloquantes et des amorces non bloquantes.

5            Selon la figure 1, on réalise une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. De manière tout à fait classique, l'extension des amorces P1 et P2 s'opère et de multiples amplicons A sont obtenus.

             Selon la figure 2, on reprend exactement la figure 1, puisqu'il s'agit d'une amplification avec amorces non bloquantes P1 et P2. Néanmoins sur le brin  
10 complémentaire et en aval de la progression de l'élongation de l'amorce P1, on ajoute une séquence, faisant office d'amorce de blocage P1b, qui est capable de s'hybrider sur le brin complémentaire, et d'empêcher l'amplification à son niveau. Dans ce cas de figure, il n'y aura aucun amplicon produit.

             Selon la figure 13, on reprend exactement les figures 1 et 2 puisqu'il s'agit d'une  
15 amplification sélective du gène G<sub>2</sub> par blocage des gènes apparentés G1 et G3 par des amorces bloquantes spécifiques et des amorces d'amplification non spécifiques.

L'invention revendique l'utilisation d'amorces de blocage comprenant des nucléotides modifiés. Ce principe est illustré sur les figures 3 à 6.

20            Selon la figure 3, le nucléotide peut être modifié sur les positions 2' ou 3' du ribose, au niveau de l'extrémité 3' de l'oligonucléotide et sur la position 5' du ribose au niveau de l'extrémité 5' dudit oligonucléotide.

             Selon la figure 4, le groupement R1 substitue, en position 3' du ribose, l'hydroxyle et permet d'empêcher l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce par la  
25 polymérase, lorsque le duplex acide nucléique - amorce bloquante est formé.

             Selon la figure 5, le groupement R3 substitue, en position 5' du ribose, le phosphate et permet de protéger l'amorce bloquante d'une dégradation de l'extrémité 5' et/ou d'un déplacement de l'amorce bloquante, lors de l'élongation de l'amorce d'amplification.

30            Selon la figure 6, le duplex acide nucléique - amorce bloquante peut être renforcé par substitution de l'hydroxyle ou de l'hydrogène en position 2' du ribose, cette

substitution pouvant se faire sur plusieurs nucléotides de l'amorce bloquante. Le groupement R2 peut être, par exemple, un radical 2' O-méthyle, qui stabilise les duplex ADN - ARN, en créant une interaction de type hydrophobe.

5           La stratégie revendiquée trouve de multiples applications chaque fois qu'un mélange de séquences apparentées est à analyser : génétique humaine ou animale, analyses d'agents infectieux (virus, bactéries, parasites,...)

A titre d'exemple, des applications dans le domaine du typage HLA (pour Human Leukocyte Antigens) sont décrites ci-après.

10           Ainsi, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comprend un ensemble de gènes situés sur le chromosome 6 chez l'homme, impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Bodmer et al. *Nomenclature for factors of the HLA system*, 1996, Tissue Antigens, 1997, 49, 297-321). Un très grand polymorphisme est observé pour ces gènes, et un jeu bien particulier de versions (ou allèles) de chacun de ces gènes est  
15 observé pour chaque individu. Il est important de noter que tout individu possède deux allèles de chaque gène, hérités l'un de la mère, l'autre du père.

Au sein de cet ensemble de gènes du CMH plus couramment nommés "gènes HLA", certains sont désormais bien connus, tant leur séquence nucléique que les fonctions des protéines correspondantes. Il s'agit essentiellement des gènes HLA dits de  
20 classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw) et des gènes HLA dits de classe II (HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP). Ces gènes participent à la régulation de la réponse immunitaire au niveau de la surveillance de l'intégrité du soi, avec différentes conséquences dans le domaine médical. Une première application concerne le domaine des greffes d'organes ou de moelle osseuse, et de nombreux travaux ont démontré l'importance d'un  
25 appariement optimal entre le donneur d'organe(s) et le receveur, pour les gènes HLA impliqués donc dans l'histocompatibilité. Une seconde application concerne l'étude de la susceptibilité de chaque individu à développer certaines pathologies induites par des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) ou par d'autres mécanismes encore mal connus (cas des maladies auto-immunes par exemple). Les gènes HLA participent alors  
30 au développement de la très grande diversité de la réponse immunitaire, observée au niveau de chaque individu, pour un groupe ethnique donné. Enfin, la détermination des

allèles des gènes HLA permet une caractérisation ou identification précise de tout individu, constituant un troisième domaine d'application du typage HLA.

Une des difficultés principales du typage HLA réside dans l'homologie structurelle observée pour ces gènes, ceux-ci ayant évolué à partir d'ancêtres communs. Il en résulte que les gènes d'intérêt sont à analyser au sein d'un ensemble de gènes fonctionnels proches, ou de gènes non fonctionnels (pseudogènes). Il est donc essentiel de maîtriser le mieux possible le ciblage de l'analyse des séquences nucléiques, en optimisant les techniques d'amplification des régions à séquencer.

Par exemple, le typage HLA-A repose sur l'analyse sélective des deux allèles du gène HLA-A observés chez un individu, en évitant l'analyse des gènes structurellement proches HLA-B et HLA-Cw. Il est donc essentiel de pouvoir amplifier spécifiquement les régions apparentées observées pour le gène HLA-A, en utilisant des amorces nucléotidiques capables de s'hybrider uniquement avec les régions ciblées sur ce gène.

Un autre exemple concerne le typage HLA-DR, où l'analyse du polymorphisme ne concerne que les gènes HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 qui correspondent aux gènes codant pour les chaînes polypeptidiques constituant les protéines fonctionnelles exprimées à la surface des cellules, en évitant la co-amplification et l'analyse des pseudogènes HLA-DRB2, HLA-DRB6, HLA-DRB7, HLA-DRB8 et HLA-DRB9. L'exemple du typage HLA-DR illustre la grande complexité du mélange de séquences nucléiques à identifier rencontrées pour un échantillon donné, et la présence de deux allèles pour chacun des gènes accroît encore la difficulté, rendant parfois l'interprétation des résultats bien délicate (ambiguïtés de typage).

En prenant pour exemple le typage HLA-DR, il peut s'avérer que la simplification de l'analyse puisse être très bénéfique, en restreignant celle-ci uniquement à l'analyse du gène HLA-DRB1 (avec ses deux allèles pour chaque individu), si les techniques d'analyse moléculaire employées font appel à la détermination d'intensité de signaux (intensité de fluorescence pour des molécules de tailles croissantes pour le séquençage) ou à l'interprétation de profils de réactivité d'hybridation d'oligosondes, par exemple. Cet objectif peut être atteint en sélectionnant des amorces nucléotidiques d'amplification spécifiques HLA-DRB1, mais cette approche n'est pas toujours possible du fait des séquences nucléiques observées pour les différents allèles du gène HLA-

DRB1 et des séquences des autres gènes HLA-DRB qui partagent une grande homologie. Une alternative consiste en la présente invention, et repose sur l'utilisation d'un mélange d'amorces spécifiques des gènes HLA-DRB mais non spécifiques du gène HLA-DRB1, et d'amorces bloquantes spécifiques des gènes HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. Il en résulte donc une amplification sélective des gènes HLA-DRB1, permettant la détermination plus facile des deux allèles HLA-DRB1 observés pour un individu donné.

Les amorces nucléotidiques sont synthétisées selon les méthodes traditionnelles comme celles utilisant la synthèse en phase solide par exemple, et sauf indications contraires, comportent un résidu -OH en 3' sur le sucre (3'-OH) permettant leur élongation lors de l'étape d'amplification. Il s'agit essentiellement d'oligonucléotides de longueur comprise entre 10 et 30 mers, selon les applications, ceci dépendant des séquences nucléiques considérées.

Les amorces nucléotidiques bloquantes sont préparées selon les méthodes citées ci-dessus et contiennent un groupement fonctionnel, qui inhibe l'élongation, situé à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide. L'objet de cette fonction bloquante est d'empêcher l'addition par la DNA polymérase, de la base suivante selon l'information lue sur la séquence complémentaire. A titre d'exemple, ce groupement fonctionnel bloquant en 3' peut être un groupement phosphate-alkylamine ( $C_6-NH_2$ ), phosphate ou dabcyl, voir à ce sujet la figure 7. Ces groupements protègent la fonction hydroxyle (3'-OH) et bloquent ainsi sa réactivité lors de la polymérisation polynucléotidique catalysée par la DNA polymérase. Le blocage de la polymérisation enzymatique peut être aussi obtenu par déshydroxylation de la position 3'. En effet, des amorces contenant des extrémités 3'-H, 2'-OH peuvent être obtenues en utilisant des réactifs appropriés et la technique d'assemblage oligonucléotidique sur support solide.

Si l'utilisation d'une amorce bloquante non chevauchante avec l'amorce non bloquante doit être envisagée, il peut être avantageux de protéger également l'extrémité 5' de l'amorce bloquante, afin que celle-ci ne soit ni dégradée par l'activité exonucléase de la polymérase, ni déplacée lors de l'élongation de l'amorce non bloquante située plus

en amont (plus en 5') de la région à amplifier. Pour cela, différentes modifications peuvent permettre de maintenir l'intégrité de l'amorce bloquante hybridée sur la séquence nucléique à inactiver. Plusieurs possibilités peuvent être citées à titre d'exemples : le noyau acridine, le diméthoxytrityle (DMT), le groupement thiophosphate, une séquence additionnelle "tige-boucle". De telles modifications sont bien représentées à la figure 8.

Le noyau acridine est un intercalant puissant, il confère ainsi au duplex amorce - séquence cible une très grande stabilité et évite le déplacement de l'amorce. Le diméthoxytrityle (DMT) utilisé comme groupement protecteur de l'extrémité 5'-hydroxyle, le groupement thiophosphate utilisé dans la stratégie antisens, et une séquence additionnelle capable de former une structure secondaire "tige-boucle" protègent l'amorce d'une éventuelle dégradation par une activité exonucléasique.

Modification en 3'	-C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> -phosphate -H -dabcyl
Modification en 5'	-acridine -DMT -thiophosphate -structure " tige-boucle "

Tableau 1 : modifications des extrémités 3' (et) 5' des amorces bloquantes

Le principe d'utilisation de mélanges d'amorces non bloquantes et d'amorces bloquantes, peut être utilisé pour l'extrémité 3' (en aval), ou pour l'extrémité 3' et pour l'extrémité 5' (en amont de la région à analyser), selon les caractéristiques des séquences nucléiques ou selon la complexité des gènes de la région à analyser.

Cette approche d'amplification utilisant des amorces bloquantes peut aussi être appliquée pour des stratégies d'amplification simple correspondant à un mélange d'amorces capables de s'hybrider sur une même séquence nucléique à analyser, ou en multiplex correspondant à plusieurs mélanges d'amorces capables de s'hybrider lors  
5 d'une même réaction d'amplification sur différentes séquences nucléiques à analyser (différents loci, différents gènes ou différentes régions de gène).

**Exemple de synthèse d'amorces oligonucléotidiques bloquées en 3' et en 5'**

10 Les amorces oligonucléotidiques bloquées ont été synthétisées sur un appareil Expidite (Perseptive Biosystems) selon la méthode au phosphoramidite par voie automatique conformément au protocole proposé par le constructeur. Les réactifs phosphoramidites nécessaires à l'introduction des modifications en 3' et en 5' ont été obtenus de chez Glenn Research.

15 La purification des oligonucléotides est réalisée par HPLC en phase inverse (colonne semi-préparative Beckman ODS 10 mm x 25 cm; C18; 5 µm de porosité; éluant: gradient de 30 min de 10 à 30% d'acétonitrile en mélange avec une solution aqueuse d'acétate de triéthylammonium 0,1 M à pH 7). Les fractions contenant l'oligonucléotide sont collectées et séchées. Les différents oligonucléotides sont ensuite  
20 repris dans de l'eau pure et quantifiés par mesure de l'absorption UV.

Pour illustrer le principe de la présente invention, deux exemples d'application dans le domaine HLA sont décrits ci-après.

25 **Exemple 1 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB3**

Plusieurs gènes HLA-DRB peuvent coder pour une chaîne polypeptidique HLA-DRβ : HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5. L'organisation de cet ensemble de gènes fonctionnels transmis de façon héréditaire, varie selon les individus,  
30 qui présentent donc différents haplotypes conservés. Si la présence d'un gène HLA-DRB1 est toujours observée, la présence de un ou deux autres gènes (HLA-DRB3,

HLA-DRB4, HLA-DRB5) est facultative, selon l'allèle HLA-DRB1 porté par le même chromosome. Par ailleurs, du fait de la présence des deux haplotypes (un hérité de la mère, l'autre du père), la complexité du mélange des séquences HLA-DRB à analyser est très variable. L'analyse de l'information principale associée aux allèles HLA-DRB1, peut  
 5 donc être délicate à interpréter selon la présence ou non des autres gènes HLA-DRB, comme par exemple le HLA-DRB3. Il peut donc être avantageux de pouvoir amplifier tous les allèles possibles HLA-DRB1 (184 inscrits à la nomenclature de 1997, *Nomenclature for factors of the HLA system, 1996, Tissue Antigens, 49, 3-II, March 1997*) sans amplifier les allèles HLA-DRB3 éventuellement présents (1 ou 2 allèles  
 10 possibles parmi les 11 allèles inscrits à la nomenclature de 1997).

Afin d'illustrer l'inhibition spécifique de l'amplification du gène DRB3, deux exemples sont décrits ci-après, le premier en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée par incorporation d'un bras aminé (oligonucléotide 5858, SEQ ID  
 15 3) et le second en utilisant un oligonucléotide comportant une extrémité 3' modifiée comportant un -H et une extrémité 5' modifiée comportant une acridine (oligonucléotide 5967, SEQ ID 4).

Les ADN ont été extraits selon les techniques classiques de lyse cellulaire, de digestion par la protéinase K, puis purifiés par précipitation éthanolique après extraction  
 20 phénolique. Les solutions d'ADN (concentration ajustée à 100 ng/μl en H<sub>2</sub>O) sont conservées à 2-8°C.

Les conditions générales d'amplification utilisées ont été les suivantes :

	- Tampon X10	:	10 μl
25	- amorce 5' générique (5867, SEQ ID NO 1 ) (10μM) (0,1μM final)	:	1 μl
	- amorce 5' bloquante (10μM) (0 à 1,2μM final)	:	0 à 12 μl
	- amorce 3' générique (P2, SEQ ID NO 2) (10μM) (0,1μM final)	:	1 μl
	- dNTP (20mM) (0,2mM final)	:	1 μl
	- Taq polymerase (5UI/μl) (1,5U)	:	0,3 μl
30	- ADN (100ng/μl) (100ng)	:	1 μl
	- H <sub>2</sub> O (QSP)	:	100 μl



Les caractéristiques du programme d'amplification utilisé avec un appareil Perkin Elmer GeneAmp 9600, ont été les suivantes :

- 2 min à 95°C (1 cycle)
- 5        30 sec à 95°C + 30 sec à 55°C + 30 sec à 72°C (32 cycles)
- 7 min à 72°C (1 cycle)

Les produits d'amplification obtenus ont été contrôlés en analysant une partie aliquote (5µl) par électrophorèse en gel d'agarose puis coloration au bromure d'éthidium. Après ce contrôle, les amplicons préparés ont été analysés avec le coffret  
10 bioMérieux de typage HLA-DR oligodetection (réf. 74 500). Ce test permet de déterminer le typage HLA-DR par technique d'hybridation reverse en microplaques, par détection et analyse des allèles HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5 (PCT/FR92/00702).

15        **Blocage DRB3 avec oligo 5'-phosphate / 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> :**

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1\*1301, DRB3\*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1 µM final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1 µM final

Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5858, SEQ ID NO 3) : 0, 0.3, 0.6,  
20 0.9, 1.2 µM final

Hybridation en microplaque :

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 2 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5858 ( $\mu$ M)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	> 2500	723	928
0.3	2109	578	101
0.6	1901	563	29
0.9	1759	374	31
1.2	1719	503	12

Ratio 0.6 / 0	0.76	0.78	0.03
---------------	------	------	------

Tableau 2 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5858 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

10

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M par rapport à la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

Les sondes 13 et 3+6 sont spécifiques du gène DRB1, et la sonde 52a est spécifique du gène DRB3. L'addition d'oligonucléotide 5858 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.6  $\mu$ M et plus.

15

Séquençage :

20

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB3, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9  $\mu\text{M}$  d'oligonucléotide 5858.

- 5 Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 56 à 65 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB3 (Figures 9 et 10).

Séquence attendue pour	5' > 3'														
	56					60					65				
DRB1*1301	CCT	GAT	GCC	GAG	TAC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC				
DRB3*01	CCT	GTC	GCC	GAG	TCC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC				
DRB1*1301+DRB3*01 (forward)	CCT	GWY	GCC	GAG	TMC	TGG	AAC	AGC	CAG	AAG	GAC				
DRB1*1301+DRB3*01 (reverse)	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG				
Séquence lue pour															
essai sans blocage	GGA	CWR	CGG	CTC	AKG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG				
essai avec blocage (0.9 $\mu\text{M}$ )	GGA	CTA	CGG	CTC	ATG	ACC	TTG	TCG	GTC	TTC	CTG				

- 10 Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB3 (oligonucléotide 5858, 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>) inhibe l'amplification du gène DRB3 comme le montre la disparition des bases apparentées en position 57 et 60, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB3\*01.

15

#### Blocage DRB3 avec oligonucléotide 5'-acridine / 3'-H

ADN : lignée OMW (ECCAC 9058), DRB1\*1301, DRB3\*01

Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1  $\mu\text{M}$  final

Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1  $\mu\text{M}$  final

- 20 Amorce HLA-DRB3 bloquante 5' (oligonucléotide 5967, SEQ ID NO 4) : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2  $\mu\text{M}$  final

Hybridation en microplaque :

Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000) observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 3 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5967 ( $\mu$ M)	Sonde 13	Sonde 3+6	Sonde 52a
0	2356	907	893
0.3	1227	251	5
0.6	1395	239	0
0.9	799	185	4
1.2	965	161	0

Ratio 0.6 / 0	0.60	0.30	0
---------------	------	------	---

Tableau 3 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5967 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB3.

Là encore, l'addition d'oligonucléotide 5967 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB3, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB3 bloquant de 0.3  $\mu$ M et plus.

Exemple 2 : blocage spécifique de l'amplification du gène HLA-DRB4

La situation est comparable à celle décrite dans l'exemple 1. Afin de simplifier l'interprétation du typage HLA-DRB1, il peut être avantageux de limiter l'amplification

HLA-DRB avec les amorces HLA-DRB génériques, au gène DRB1, sans co-amplification du gène DRB4. La présente invention décrit l'utilisation d'amorces spécifiques DRB4 bloquantes.

- 5 Les protocoles expérimentaux sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1.  
 ADN : lignée T7526 (ECCAC 9076), DRB1\* 0901, DRB4\*01  
 Amorce HLA-DRB générique 5' (oligonucléotide 5867, SEQ ID NO 1) : 0.1  $\mu$ M final  
 Amorce HLA-DRB générique 3' (oligonucléotide P2, SEQ ID NO 2) : 0.1  $\mu$ M final  
 Amorce HLA-DRB4 bloquante 5' (oligonucléotide 5965, SEQ ID NO 5) : 0, 0.3, 0.6,  
 10 0.9, 1.2  $\mu$ M final

Hybridation en microplaque :

- 15 Les valeurs des signaux d'hybridation (densité optique lue à 492 nm x1000)  
 observées pour chacune des sondes spécifiques, sont reportées dans le tableau 4 ci-dessous.

Conc. finale d'amorce bloquante 5965 ( $\mu$ M)	Sonde 9	Sonde 53
0	1769	1320
0.3	1935	110
0.6	1754	41
0.9	1750	29
1.2	1516	14

Ratio 0.6 / 0	0.99	0.03
---------------	------	------

- 20 Tableau 4 : signaux d'hybridation de l'amorce bloquante 5965 à différentes séquences cibles en fonction de sa concentration

Le calcul du ratio de la valeur lue pour 0.6  $\mu$ M / la valeur lue sans blocage, permet d'apprécier l'inhibition de l'amplification du gène DRB4.

La sonde 9 est spécifique du gène DRB1, et la sonde 53 est spécifique du gène DRB4. L'addition d'oligonucléotide 5965 lors de l'amplification, inhibe l'amplification du gène DRB4, sans affecter l'amplification du gène DRB1. Cette inhibition est dose dépendante, et l'inhibition totale est observée pour une concentration d'oligonucléotide DRB4 bloquant de 0.6  $\mu$ M et plus.

#### 10 Séquençage :

Les produits d'amplification obtenus avec ou sans blocage du gène DRB4, ont été séquencés en utilisant le kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (perkin-Elmer réf. 4303152). Les électrophorégrammes de la réaction Reverse sont reportés ci-après, pour l'essai sans blocage et pour l'essai avec blocage par 0.9  $\mu$ M d'oligonucléotide 5965.

Le montage des électrophorégrammes concernant la région codant pour les acides aminés 29 à 47 (Nomenclature officielle HLA) des gènes HLA-DRB, illustre l'inhibition de l'amplification du gène HLA-DRB4 (Figures 11 et 12).

20

Séquence attendue pour	5' > 3'																							
	30						35						40						45					
DRB1*0901	AGA	<b>G</b> GC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	<b>A</b> AC	<b>G</b> TG	CGC	<b>T</b> TC	<b>G</b> AC	AGC	GAC	<b>G</b> TG	GGG	GAG	TAC					
DRB4*01	AGA	<b>T</b> AC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	<b>T</b> AC	<b>G</b> CG	CGC	<b>T</b> AC	<b>A</b> AC	AGT	GAC	<b>C</b> TG	GGG	GAG	TAC					
DRB1*0901+DRB4*01 (forward)	AGA	<b>K</b> RC	ATC	TAT	AAC	CAA	GAG	GAG	<b>W</b> AC	<b>G</b> YG	CGC	<b>T</b> WC	<b>R</b> AC	AGY	GAC	<b>S</b> TG	GGG	GAG	TAC					
DRB1*0901+DRB4*01 (reverse)	TCT	<b>M</b> YG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	<b>W</b> TG	<b>C</b> RC	GCG	<b>A</b> WG	<b>Y</b> TG	<b>T</b> CR	CTG	<b>S</b> AC	CCC	CTC	ATG					
Séquence lue pour																								
essai sans blocage	TCT	<b>M</b> YG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	<b>W</b> TG	<b>C</b> RC	GCG	<b>A</b> WG	<b>Y</b> TG	<b>T</b> CR	CTG	<b>S</b> AC	CCC	CTC	ATG					
essai avec blocage (0.9 $\mu$ M)	TCT	CGG	TAG	ATA	TTG	GTT	CTC	CTC	TTG	CAC	GCG	AAG	CTG	TCG	CTG	CAC	CCC	CTC	ATG					

Ainsi, l'addition d'amorce bloquante spécifique DRB4 (oligonucléotide 5965, 3'-C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>) inhibe l'amplification du gène DRB4 comme le montre la disparition des bases

apparentées en positions 30, 37, 38, 40, 41, 42 et 44, démontrant l'absence de la séquence correspondant à l'allèle DRB4\*01.

La présente invention peut être appliquée au typage HLA-DRB1 de haute résolution, le blocage spécifique de l'amplification spécifique des gènes HLA-DRB3, -  
5 DRB4, -DRB5 et des pseudogènes HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 et -DRB9 par l'utilisation d'amorces bloquantes réduisant l'analyse à un mélange de une (cas d'un échantillon homozygote) ou de deux séquences nucléotidiques (cas d'un échantillon hétérozygote). Une telle stratégie utilise des amorces bloquantes HLA-DRB3  
spécifiques (oligonucléotides 5816 (SEQ ID NO 6), 5868 (SEQ ID NO 7), 5885 (SEQ  
10 ID NO 8) à titre d'exemples), des amorces HLA-DRB4 spécifiques (oligonucléotides 5883 (SEQ ID NO 9), 5916 (SEQ ID NO 10), 5917 (SEQ ID NO 11) à titre d'exemples) et des amorces HLA-DRB5 spécifiques (oligonucléotides 5021 (SEQ ID  
NO 12), 5870 (SEQ ID NO 13), 5871 (SEQ ID NO 14), 5881 (SEQ ID NO 15), 5902 (SEQ ID NO 16), 5903 (SEQ ID NO 17), 5913 (SEQ ID NO 18), 5914 (SEQ ID NO  
15 19) à titre d'exemples), modifiés en leurs extrémités 3' et 5' comme décrit plus haut.

Un blocage complet des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 peut être réalisé en utilisant un mélange d'amorces bloquantes.

Dans le tableau 5 qui suit, i représente l'inosine.

Référence bioMérieux	SEQ ID NO	Séquence nucléotidique (5' > 3')	Modif <sup>o</sup> en 5'	Modif <sup>o</sup> en 3'
5867	1	ATC CTT CGT GTC CCC ACA GCA CG	-	-
P2	2	TCG CCG CTG CAC TGT GAA G	-	-
5858	3	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5967	4	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-acridine	-H
5965	5	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	..C <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
5816	6	CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5868	7	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GCT	-	-
5885	8	CCC CCC AGC ACG TTT CTT GGA GiT	-	-
5883	9	CAT TTC CTC AAT GGG ACG GAG iia	-	-
5916	10	CCC CCA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5917	11	CCC ACA GCA CGT TTC TTG GAG CAi GC	-	-
5021	12	CA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5870	13	CA GCA CGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5871	14	CA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5881	15	CA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5902	16	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5903	17	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG GA	-	-
5913	18	CCC ACA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-
5914	19	CCC CCA GCA iGT TTC TTG CAG CAG iA	-	-

Tableau 5 : séquence nucléotidique des oligonucléotides utilisés comme  
amorces pour l'amplification

5

L'inosine, base non naturelle, est utilisée afin de fragiliser l'hybride acide nucléique - amorce de blocage. En effet, l'inosine est relié à son nucléotide



complémentaire par deux liaisons hydrogènes et donc lorsqu'on la substitue à une pyrimidine, la liaison entre les deux brins, à son niveau, est plus faible. Un gène pouvant varier d'autres gènes apparentés par une seule base, il est intéressant de substituer sur l'amorce de blocage, complémentaire du gène, les bases autour de cette position cruciale  
5 par des inosines. Le duplex acide nucléique - amorce de blocage devenant ainsi fragilisé, il ne peut y avoir hybridation que si l'amorce est parfaitement complémentaire de la séquence génique cible. On renforce ainsi la spécificité de l'amorce de blocage.

La présente invention concerne donc un procédé d'amplification sélective de gènes présents dans un mélange de gènes apparentés, par utilisation d'amorces  
10 oligonucléotidiques bloquantes correspondant à des oligonucléotides comportant une extrémité 3' modifiée ne permettant pas leur élongation lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes cibles.

L'invention concerne également l'utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit dans la revendication 1, comportant une extrémité 5' modifiée ne permettant pas leur déplacement ou leur dégradation, lors des étapes d'amplification enzymatique des gènes  
15 cibles par une amorce spécifique d'une région située plus en 5' sur le même gène.

Dans le cas d'une utilisation d'amorces bloquantes au sens décrit ci-dessus la modification à l'extrémité 5' est facultative. Ainsi, deux possibilités différentes existent.

Selon un premier mode d'utilisation, le groupement -OH en 3' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un groupement -H, -  
20 phosphate, -dabcyl, ou une chaîne carbonée terminée par un groupement -NH<sub>2</sub>, à titre d'exemples.

Selon un second mode d'utilisation, le groupement -phosphate en 5' est remplacé par un groupement naturellement non trouvé dans la nature, comme un  
25 groupement -DMT, acridine, -thiophosphate, ou une structure " tige-boucle ", à titre d'exemples.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, peuvent aussi comporter des modifications de l'oligonucléotide en position non terminale et sont utilisées afin de favoriser leur hybridation sur leurs séquences cibles.

Les amorces bloquantes, telles que décrites ci-dessus, sont capables de s'hybrider sur le brin codant ou sur le brin complémentaire (utilisation d'amorces bloquantes 5' ou d'amorces bloquantes 3').

5 Il est également possible d'utiliser une amorce bloquante ou un mélange d'amorces bloquantes.

L'utilisation d'amorces bloquantes est particulièrement intéressante pour les méthodes d'amplification des séquences cibles, comme par exemple la PCR, la TMA ou tout autre technique.

10 L'invention concerne enfin l'utilisation d'une ou de plusieurs amorces bloquantes pour l'inhibition de l'amplification des gènes HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5, choisies parmi celles qui sont définies par les séquences SEQ ID Nos :3 à 19, et leurs complémentaires.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'au moins une séquence nucléotidique particulière d'un acide nucléique de synthèse ou naturel contenu dans un mélange réactionnel, le  
5 mélange réactionnel étant constitué d'au moins un acide nucléique comportant au moins deux séquences nucléotidiques apparentées et/ou d'au moins deux acides nucléiques comportant chacun au moins une séquence nucléotidique apparentée ; le procédé utilisant au moins un type d'amorces d'amplification capables de s'hybrider avec l'acide  
10 nucléique pour permettre l'amplification des séquences nucléotidiques apparentées, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter, dans le mélange réactionnel, au moins une séquence, faisant office d'amorce de blocage, qui est capable :

- de s'hybrider à au moins une séquence nucléotidique, qui n'est pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier, et
- d'empêcher à son niveau l'élongation de l'amorce d'amplification.

15

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les amorces de blocage sont capables de s'hybrider à la ou à toutes les séquences nucléotidiques, qui ne sont pas la ou les séquences nucléotidiques particulières à amplifier.

20

3. Amorce de blocage utilisée dans un procédé d'amplification, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage est un oligonucléotide à base de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides et/ou de nucléotides modifiés, tels que des PNA ou des nucléotides thiophosphates.

25

4. Amorce, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que chaque amorce de blocage comporte au moins un élément qui empêche l'amplification.

30

5. Amorce, selon la revendication 4, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 3' de l'amorce de blocage et ne permet pas son élongation.

6. Amorce, selon la revendication 5, caractérisée par le fait que l'élément, qui empêche l'amplification, est situé à l'extrémité 5' de l'amorce de blocage et fait office d'élément protecteur.

5           7. Amorce, selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par un nucléotide ou nucléotide modifié ou par un oligonucléotide comportant ou non au moins un nucléotide modifié ; le nucléotide, le nucléotide modifié ou l'oligonucléotide ne s'hybride pas sur l'acide nucléique.

10

8. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée par le fait que chaque élément, qui empêche l'amplification, est constitué par une molécule, différente d'un nucléotide ou d'un nucléotide modifié.

15

9. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée par le fait que l'élément est constitué par au moins cinq, notamment au moins dix et préférentiellement au moins quinze nucléotides, nucléotides modifiés ou un mélange de nucléotide(s) et de nucléotide(s) modifié(s).

20

10. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est suffisamment long pour permettre la formation d'une boucle et d'une hybridation entre les nucléotides et/ou les nucléotides modifiés, qui constituent cette boucle.

25

11. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 4 à 7 ou 9, caractérisée par le fait que l'élément est constitué d'une "queue" de polynucléotides et/ou de polynucléotides modifiés, qui comporte tous les mêmes bases.

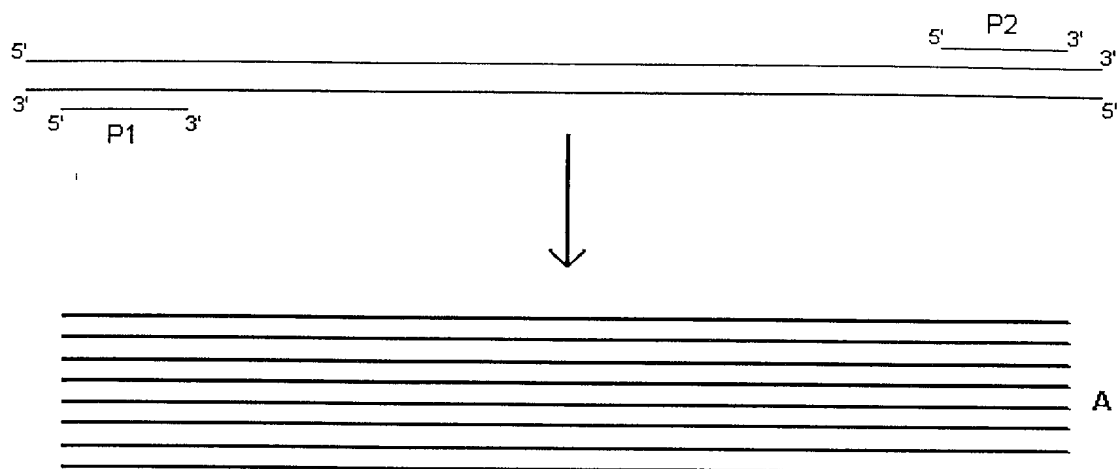
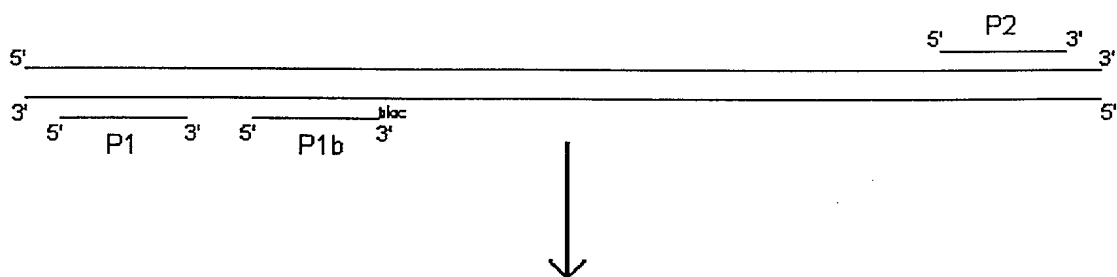
30

12. Amorce dans laquelle l'élément ne permet pas l'élongation, selon l'une quelconque des revendications 4, 5 ou 7 à 11, caractérisée par le fait que

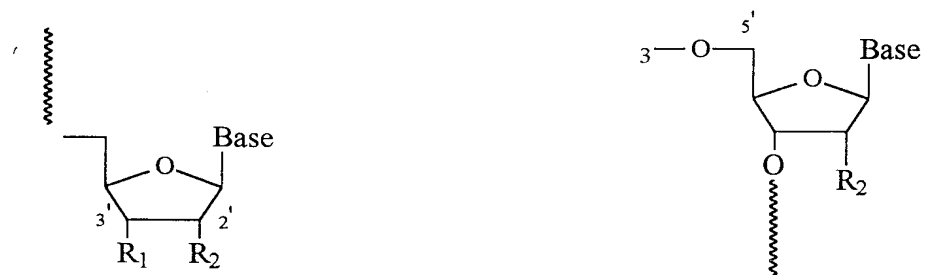
l'élément substitué à l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou du groupement hydroxyle, placé en position 3' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 3' de l'acide nucléique.

- 5           13. Amorce dans laquelle l'élément est protecteur, selon l'une quelconque des revendications 4, 6 à 12, caractérisée par le fait que l'élément est :
- substitué au phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5' de l'acide nucléique, ou
  - greffé sur le phosphate, placé en position 5' du ribose, lui-même situé à l'extrémité 5'
- 10 de l'acide nucléique.

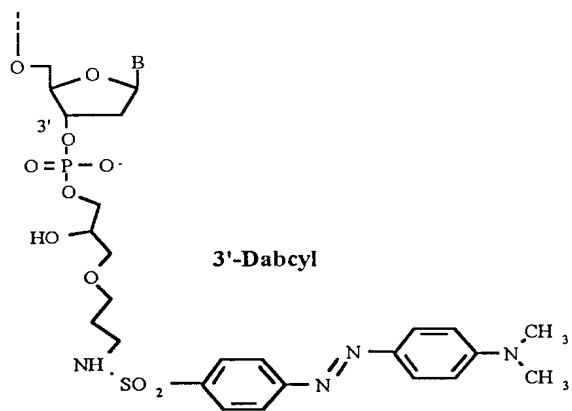
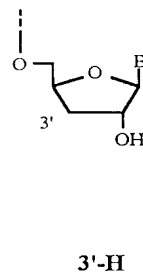
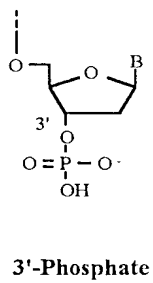
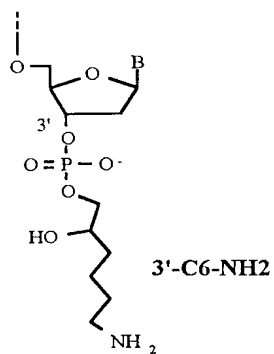
1/7

Fig. 1Fig. 2

2/7

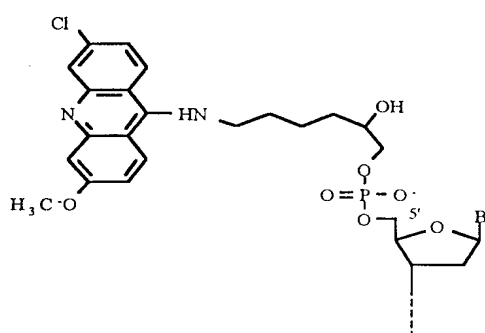
Fig. 3Fig. 4Fig. 5Fig. 6

3/7

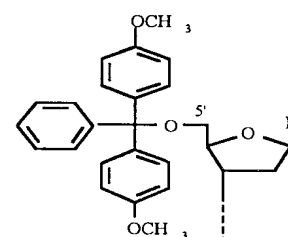
**Fig. 7**



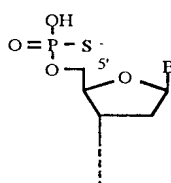
4/7



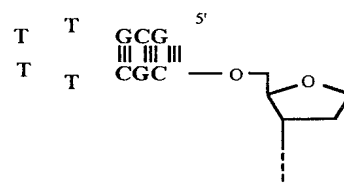
5'-Acridine



5'-DMT



5'-Thiophosphate



5'-Tige-Boucle

Fig. 8

5/7

3'                      60                      57                      5'

TCCITCTGGCTGTTCCAGKACTCGGCRCWAGG

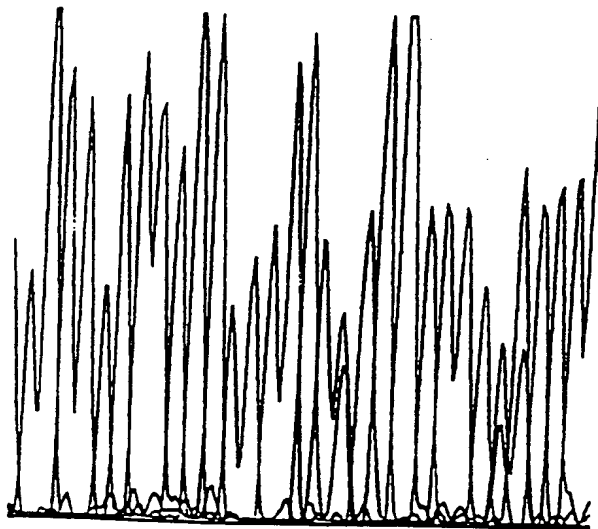


Fig. 9

3' 60 57 5'  
TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGCATCAGG

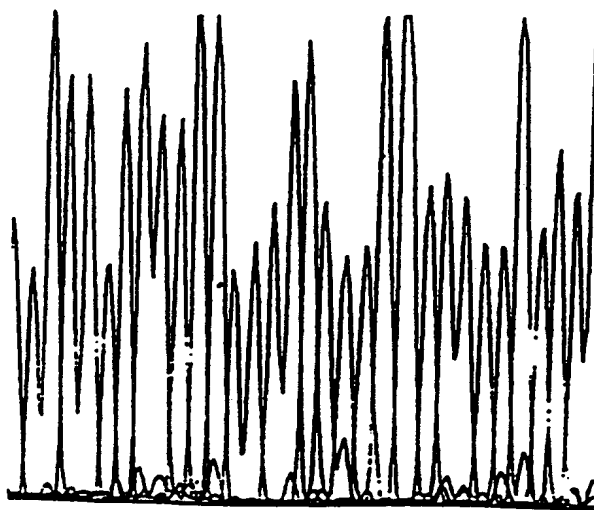
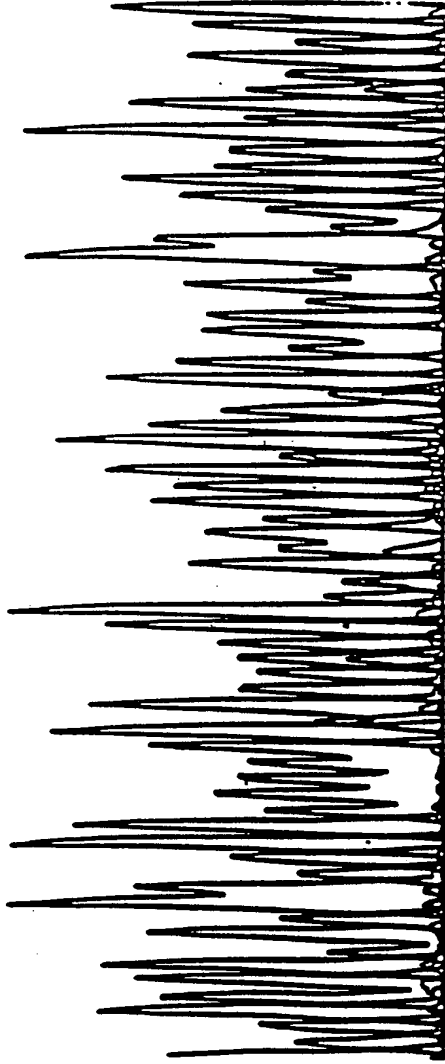
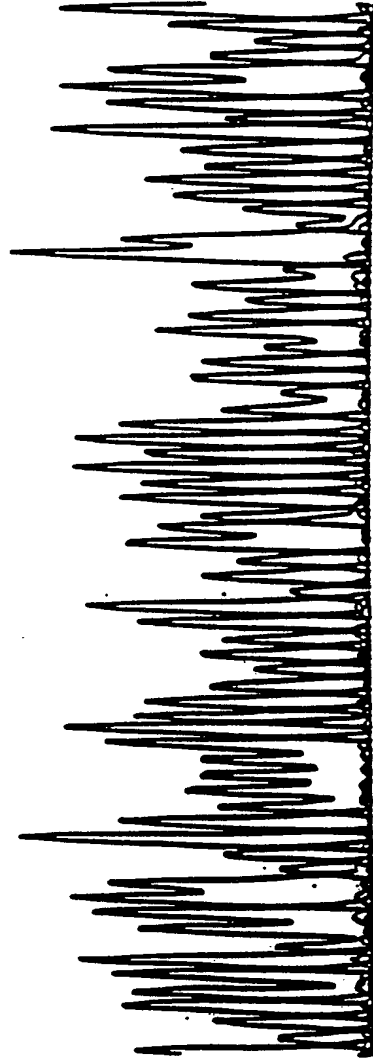


Fig. 10

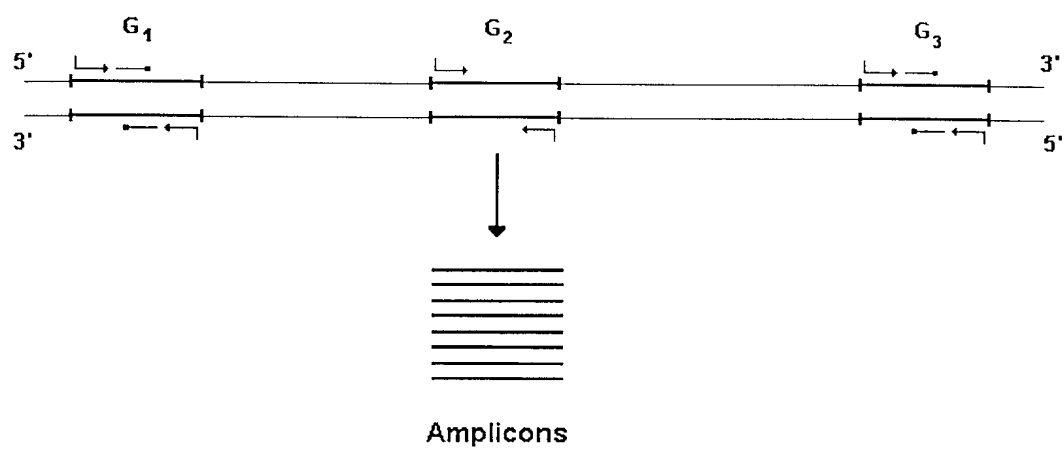
3' GTACCGCCCGGTTACTCCGCCAAGTCRCCTGTGTGWAAGCGCRCGTWCCTCCTCTTGGTTATAGATGMYMTCTG 5'

Fig. 11

3' GTACCGCCCGGTTACTCCGCCAAGTCRCCTGTGTGWAAGCGCRCGTWCCTCCTCTTGGTTATAGATGMYMTCTG 5'

Fig. 12

7/7



→ Amorce d'amplification

← Amorce bloquante

Fig. 13

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: BIOMERIEUX
- 5 (B) RUE: CHEMIN DE L'ORME
- (C) VILLE: MARCY L'ETOILE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 69280

- 10 (ii) TITRE DE L'INVENTION: Procédé d'amplification d'au moins une  
séquence nucléotidique particulière et  
amorces mises en oeuvre

## (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 19

15

## (iv) ADRESSE DE CORRESPONDANCE:

- (A) NOM: Cabinet GERMAIN & MAUREAU
- (B) RUE: 12 rue Boileau
- (C) VILLE: LYON
- 20 (D) PAYS: FRANCE
- (E) CODE POSTAL: 69006
- (F) TELEPHONE: 04 72 69 84 30
- (G) TELEFAX: 04 72 69 84 31

## 25 (v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: disquette 3,5 pouces DS, HD
- (B) ORDINATEUR: EPSON (compatible IBM)
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: DOS
- (D) LOGICIEL: MICROSOFT WORD POUR WINDOWS

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- 35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:  
ATCCTTCGTG TCCCCACAGC ACG 23
- 5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 10 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:  
TCGCCGCTGC ACTGTGAAG 19
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 20 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE :
- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMBLEMMENT : 24 (extrémité 3')
- 25 (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:  
CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:
- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT : 1 (extrémité 5')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe  
acridine

## 5 (ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT : 24 (extrémité 3')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par H

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

10 CCCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- 15 (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE :

- 20 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT : 24
- (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

## (ix) CARACTERISTIQUE :

- 25 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière
- (B) EMPLACEMENT : 26 (extrémité 3')
- (D) AUTRES INFORMATIONS : modification par le groupe  
C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

30 CCCACAGCAC GTTCTTGGG GCAGGC

26

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- 35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:  
CCCAGCACGT TTCTTGGAGC T 21
- 5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
10 (D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:  
CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGCT 24
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
20 (D) CONFIGURATION: linéaire  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
(A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMPLACEMENT : 23  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:  
CCCCCAGCA CGTTTCTTGG AGGT 24
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:  
30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(ix) CARACTERISTIQUE :



- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMBLEMMENT : 22  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
5 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMBLEMMENT : 23  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:  
CATTCCTCA ATGGGACGGA GGGA 24
- 10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
15 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
(A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
20 (B) EMBLEMMENT : 24  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:  
CCCCCAGCAC GTTCTTGGA GCAGGC 26
- 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:  
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
30 (D) CONFIGURATION: linéaire  
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
(ix) CARACTERISTIQUE :  
(A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMBLEMMENT : 24  
35 (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)  
(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCACAGCAC GTTTCTTGGA GCAGGC

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CACGTTTCTT GCAGCAGGA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 15 (A) LONGUEUR: 22 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CAGCACGTTT CTTGCAGCAG GA

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30 (ix) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : caractéristique particulière  
(B) EMLACEMENT : 3  
(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

35 CAGGTTTCTT GCAGCAGGA

19

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

10 (B) EMPLACEMENT : 6

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CAGCAGGTTT CTTGCAGCAG GA

22

## 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

20 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

25 (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CCCCCAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

## 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

5 CCCACAGCAG GTTTCTTGCA GCAGGA

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

10 (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

15 (A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

20 (B) EMPLACEMENT : 25

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CCCACAGCAG GTTTCTTGCA GCAGGA

26

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 10

35 (D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(ix) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : caractéristique particulière

(B) EMPLACEMENT : 25

(D) AUTRES INFORMATIONS : G signifie inosine (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

5 CCCCCAGCAG GTTCTTGCA GCAGGA

26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01247

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 293 238 A (INCELTEC LTD ;WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 March 1996 (1996-03-20) the whole document	1-5,7-9, 12
Y	LEWIS A P ET AL.: "Taq DNA polymerase extension of internal primers blocks polymerase chain reactions allowing differential amplification of molecules with identical 5' and 3' ends." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 14, 1994, pages 2859-2861, XP002092519 the whole document	1-9,13
Y	US 5 573 907 A (CARRINO JOHN J ET AL) 12 November 1996 (1996-11-12) the whole document	1-9,12, 13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1999

Date of mailing of the international search report

02/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01247

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 07235 A (ABBOTT LAB) 27 February 1997 (1997-02-27) abstract; claims 1,5,7 ----	1-5,7-9
Y	WO 94 03630 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC ;ADAMS CRAIG W (US); DANIELS DAVID W (US)) 17 February 1994 (1994-02-17) abstract page 48, line 25 - page 49, line 8; claim 1 ----	1-5,7-9, 12
A	WO 96 40992 A (ABBOTT LAB) 19 December 1996 (1996-12-19) the whole document ----	
A	SANGER F ET AL: "DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 74, no. 12, December 1977 (1977-12), pages 5463-5467, XP000614975 the whole document ----	
P,X	WO 98 28443 A (DADE BEHRING MARBURG GMBH ;ULLMAN EDWIN F (US)) 2 July 1998 (1998-07-02) the whole document ----	1-5,7-9, 12
P,X	BI W AND STAMBROOK J: "Detection of known mutation by proof-reading PCR" NUCEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 12, 1998, pages 3073-3075, XP002092520 the whole document -----	1-5,7-9, 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2293238 A	20-03-1996	NONE	
US 5573907 A	12-11-1996	AU 4687393 A	03-03-1994
		CA 2140331 A	17-02-1994
		EP 0654093 A	24-05-1995
		JP 8501212 T	13-02-1996
		US 5516663 A	14-05-1996
		WO 9403636 A	17-02-1994
		AT 137269 T	15-05-1996
		AU 635105 B	11-03-1993
		AU 7000791 A	01-08-1991
		CA 2035010 A,C	27-07-1991
		DE 69118930 D	30-05-1996
		DE 69118930 T	09-01-1997
		EP 0439182 A	31-07-1991
		ES 2089038 T	01-10-1996
		JP 1980321 C	17-10-1995
		JP 4211399 A	03-08-1992
		JP 6036760 B	18-05-1994
		KR 9513953 B	18-11-1995
		KR 9602235 B	13-02-1996
		US 5792607 A	11-08-1998
		US 5453355 A	26-09-1995
		US 5427930 A	27-06-1995
WO 9707235 A	27-02-1997	CA 2229226 A	27-02-1997
		EP 0845047 A	03-06-1998
		JP 11502124 T	23-02-1999
WO 9403630 A	17-02-1994	AU 676197 B	06-03-1997
		AU 4802793 A	03-03-1994
		CA 2141537 A	17-02-1994
		EP 0658212 A	21-06-1995
		FI 950487 A	10-03-1995
		JP 7509371 T	19-10-1995
		NO 950402 A	03-04-1995
		PL 307341 A	15-05-1995
WO 9640992 A	19-12-1996	CA 2223050 A	19-12-1996
		EP 0832280 A	01-04-1998
		US 5814492 A	29-09-1998
WO 9828443 A	02-07-1998	CA 2246225 A	02-07-1998
		EP 0904412 A	31-03-1999



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der te Internationale No

PCT/FR 99/01247

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GB 2 293 238 A (INCELTEC LTD ; WAKEFIELD ANDREW JEREMY (GB)) 20 mars 1996 (1996-03-20) le document en entier	1-5, 7-9, 12
Y	LEWIS A P ET AL.: "Taq DNA polymerase extension of internal primers blocks polymerase chain reactions allowing differential amplification of molecules with identical 5' and 3' ends." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 14, 1994, pages 2859-2861, XP002092519 le document en entier	1-9, 13
Y	US 5 573 907 A (CARRINO JOHN J ET AL) 12 novembre 1996 (1996-11-12) le document en entier	1-9, 12, 13
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De            de Internationale No  
PCT/FR 99/01247

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 97 07235 A (ABBOTT LAB) 27 février 1997 (1997-02-27) abrégé; revendications 1,5,7 ----	1-5,7-9
Y	WO 94 03630 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC ;ADAMS CRAIG W (US); DANIELS DAVID W (US)) 17 février 1994 (1994-02-17) abrégé page 48, ligne 25 - page 49, ligne 8; revendication 1 ----	1-5,7-9, 12
A	WO 96 40992 A (ABBOTT LAB) 19 décembre 1996 (1996-12-19) le document en entier ----	
A	SANGER F ET AL: "DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 74, no. 12, décembre 1977 (1977-12), pages 5463-5467, XP000614975 le document en entier ----	
P,X	WO 98 28443 A (DADE BEHRING MARBURG GMBH ;ULLMAN EDWIN F (US)) 2 juillet 1998 (1998-07-02) le document en entier ----	1-5,7-9, 12
P,X	BI W AND STAMBROOK J: "Detection of known mutation by proof-reading PCR" NUCEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 12, 1998, pages 3073-3075, XP002092520 le document en entier -----	1-5,7-9, 12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de internationale No

PCT/FR 99/01247

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2293238 A	20-03-1996	AUCUN	
US 5573907 A	12-11-1996	AU 4687393 A CA 2140331 A EP 0654093 A JP 8501212 T US 5516663 A WO 9403636 A AT 137269 T AU 635105 B AU 7000791 A CA 2035010 A,C DE 69118930 D DE 69118930 T EP 0439182 A ES 2089038 T JP 1980321 C JP 4211399 A JP 6036760 B KR 9513953 B KR 9602235 B US 5792607 A US 5453355 A US 5427930 A	03-03-1994 17-02-1994 24-05-1995 13-02-1996 14-05-1996 17-02-1994 15-05-1996 11-03-1993 01-08-1991 27-07-1991 30-05-1996 09-01-1997 31-07-1991 01-10-1996 17-10-1995 03-08-1992 18-05-1994 18-11-1995 13-02-1996 11-08-1998 26-09-1995 27-06-1995
WO 9707235 A	27-02-1997	CA 2229226 A EP 0845047 A JP 11502124 T	27-02-1997 03-06-1998 23-02-1999
WO 9403630 A	17-02-1994	AU 676197 B AU 4802793 A CA 2141537 A EP 0658212 A FI 950487 A JP 7509371 T NO 950402 A PL 307341 A	06-03-1997 03-03-1994 17-02-1994 21-06-1995 10-03-1995 19-10-1995 03-04-1995 15-05-1995
WO 9640992 A	19-12-1996	CA 2223050 A EP 0832280 A US 5814492 A	19-12-1996 01-04-1998 29-09-1998
WO 9828443 A	02-07-1998	CA 2246225 A EP 0904412 A	02-07-1998 31-03-1999